



自生地が消失した岐阜県高山市におけるサクラソウ 残存個体の由来推定

吉田, 康子
中澤, 宏介
大澤, 良

(Citation)

保全生態学研究, 24(2):221-230

(Issue Date)

2019-11-10

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2019 一般社団法人 日本生態学会.

この記事はクリエイティブ・コモンズ [表示 4.0 国際]ライセンスの下に提供されています。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90007979>



調査報告

自生地が消失した岐阜県高山市における サクラソウ残存個体の由来推定

吉田 康子^{1,*}・中澤 宏介²・大澤 良³

¹ 神戸大学大学院農学研究科附属食資源教育研究センター

² 高山市役所

³ 筑波大学大学院生命環境系

Origin of the remaining *Primula sieboldii* individuals derived from an extinct population in Takayama

Yasuko Yoshida^{1,*}, Kosuke Nakazawa² and Ryo Ohsawa³

¹ Food Resources Education and Research Center, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

² Takayama city government

³ Graduate school of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

要旨：サクラソウは岐阜県のレッドリストの絶滅危惧Ⅰ類に指定されており、高山市清見町にもかつてサクラソウの自生地（清見集団）が存在した。現在、清見町内の民家で栽培されているサクラソウの一部が清見集団由来であると言われている。本研究では、町内の民家で栽培されているサクラソウの所有者からの聞き取り調査や SSR マーカーの遺伝子型に基づくジェネット識別、STRUCTURE 解析およびアサインメントテストを行い、自生地が消失した清見集団由来の個体の探索を試みた。2012 年と 2013 年に清見町内の民家 14 ヶ所および野外 2 ヶ所から採取した 62 サンプルから、SSR マーカー 8 座の遺伝子型によって 16 のジェネットが見出された。聞き取り調査によって、4 ジェネット（g2、g3、g4、g6）が清見集団由来である可能性が高く、遺伝的に近縁関係であることも明らかになった。全国 32 集団と清見町内の 16 ジェネットを 1 集団として STRUCTURE 解析を行った結果、清見集団由来と考えられる 4 ジェネットは、それぞれ異なる遺伝組成のパターンを示した。さらに 16 ジェネットの由来推定を行うため、32 集団に対してアサインメントテストを行った。本来であれば割り振り先の集団に清見集団を加え、そこに割り振られたジェネットを清見集団由来とすべきであるが、清見集団の遺伝情報が不明であるため、本研究では高山市内に現存する野生集団（高山集団）と清見集団が遺伝的に近縁であると想定し、アサインメントテストで高山集団に割り振られたジェネットを清見集団由来の可能性があると考えた。その結果、高山集団を含む 32 集団いずれかの集団で生じる確率が 0% より有意に高くなったのは 4 ジェネット（g3、g4、g12、g16）で、そのうち高山集団に割り振られたのは g3 だけであった。しかしその確率が非常に低く、清見集団由来のジェネットであると判断できなかった。本研究では、町内で見出された 16 ジェネットのうち聞き取り調査によって 4 ジェネットが清見集団由来の可能性あることが判明したが、遺伝子型情報に基づく解析ではこれらが清見集団由来であるとの確実な裏づけは得られなかった。そして、サクラソウの自生地が消失、またその周辺の野生集団が著しく減少した状況下では、個体の由来推定の精度が大きく低下することも示された。

キーワード：アサインメントテスト、推定精度、STRUCTURE 解析

Abstract: *Primula sieboldii* E. Morren (Primulaceae) is an endangered species in Gifu Prefecture, Japan. There was once a wild population in Kiyomi, located in Takayama, Gifu. It is said that some individuals cultivated by people living in Kiyomi originated from the extinct Kiyomi population. In this study, we aimed to identify original genets in the Kiyomi population based

* 〒 675-2103 兵庫県加西市鶴野町 1348 神戸大学大学院農学研究科附属食資源教育研究センター

Food Resources Education and Research Center, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, 1348 Uzurano, Kasai, Hyogo 675-2103, Japan

e-mail: yasukoy@landscape.kobe-u.ac.jp 2019 年 5 月 24 日受付、2019 年 9 月 3 日受理、2019 年 11 月 10 日早期公開 (J-STAGE)

on a questionnaire, a STRUCTURE analysis, and an assignment test based on DNA analysis. We detected 16 genets from 62 samples using eight SSR markers. Of the 16 genets, four (g2, g3, g4, and g6) likely originated from the Kiyomi population based on the questionnaire and their close genetic relationships. In the STRUCTURE analysis, these four genets had different genetic compositions. To examine whether the 16 genets originated from the extinct Kiyomi population, we performed an assignment test using the Takayama population, which is expected to be genetically close to the Kiyomi population. The assignment test assigned only g3 to the Takayama population, but the genet was not considered an original due to the very low probability. In conclusion, four genets were identified as likely original genets based on the questionnaire, but no positive proof was obtained from the DNA analysis following the extinction of the native population.

Keywords: assignment test, estimation accuracy, STRUCTURE analysis

はじめに

サクラソウ *Primula sieboldii* E. Morren は北海道からアジア北東部に分布する異型花柱性の多年生草本である (Yamazaki 1993)。柱頭が高く葯が低い位置にある長花柱花と柱頭が低く葯が高い位置にある短花柱花の2つの花型間の他家受粉により種子繁殖が行われる (鷺谷 2006)。また地下茎による生理的に独立したラメットを形成するクローン成長も行うため、一見多くの個体 (ラメット) が生育しているように見えても、遺伝的には少数の個体 (ジェネット) しか残存していない集団が存在する (吉田 私信)。ジェネット数が著しく減少した集団では遺伝的多様性が低く、近親交配が進みやすいため (鷺谷 2006)、集団内のジェット数の維持が不可欠である。また異型花柱性であるサクラソウの種子繁殖には、長花柱花と短花柱花の割合が大きく関係するため、集団の長期的な存続にはジェネット数だけでなく花型比も重要となる (吉田ほか 2012)。これまで開発や乱獲による著しい個体数の減少から絶滅危惧 II 類に指定されていたが (環境庁 2000)、各地での保全努力により絶滅リスクが減少したとして 2007 年に準絶滅危惧類に指定された (Iwatsuki 2008)。しかしすでに絶滅した集団も多く、現在でも多くの都道府県で絶滅危惧種に指定されている。

岐阜県には過去に少なくとも 5 つのサクラソウ自生地があったとされ、そのうち現在の高山市域に存在していた 3 つの自生地も現存するのは 1 ヶ所のみとなった (岐阜県博物館学芸部自然係 1993)。このような状況から、平成 13 年にサクラソウは岐阜県のレッドリストの絶滅危惧 I 類に指定されるとともに (岐阜県の絶滅のおそれのある野生生物 - 岐阜県レッドデータブック -2001: 岐阜県 2001)、平成 15 年には特に存続の危険性の高い種として、岐阜県の「希少野生生物 16 種」の 1 つに選定された。

岐阜県高山市清見町 (旧大野郡清見村) は、面積のおよそ 96% が森林で覆われており、フクジュソウ *Adonis ramosa* Franch. やザゼンソウ *Symplocarpus renifolius* Schott ex Tzvelev、町の花であるカタクリ *Erythronium japonicum* Decne. などの群生地を観光名所としている自然豊かな町である。清見町にもかつてサクラソウの自生地があったが (清見村教育委員会 1989)、土地改変によりその自生地はすでに失われている。現在、清見町内の複数の民家においてサクラソウが栽培されており、そのうちの一部はかつて存在した町内の自生地由来であると言われている。また、人為的に移動させられたと考えられるサクラソウが野生の状態の一部生育している。近年、清見町では地域固有の遺伝資源を保全するため、町内の自生地由来のサクラソウを特定し、系統保存していこうとする試みが行われている。しかし、自生地が消失してから 20 年以上が経過しており、詳細な採取・導入に関わる記録がないことなどから、民家で栽培されているサクラソウの由来情報は乏しく、一部の現地住民からどの個体が町内の自生地由来であるのか明らかにしたいとの要望もあがっている。またサクラソウはクローン成長するため、栽培中に増えた個体が個人間で譲渡されることもあり、遺伝子型情報に基づいてジェネットを同定したうえで、清見町内のサクラソウ個体を整理する必要がある。

個体の由来推定には、個体の所有者へ丁寧な聞き取り調査や現存集団との遺伝的類似性や集団構造の評価、個体の由来確率の算出などを行いながら、総合的に判断していく必要がある。由来推定に有効な手法のひとつにアサインメントテスト (Manel et al. 2005) がある。アサインメントテストとは、各地域や集団の遺伝子型組成に基づいて、ある個体の遺伝子型がそれぞれの集団で生じる確率を算出する手法である。任意交配や連鎖平衡を仮定しているが、本城・北本 (2010) はこの仮定が満たされ

ない場合にも問題なく由来推定ができる場合がある (Cornuet et al. 1999) ことを紹介している。サクラソウではこれまでに、本来由来とする集団 (ジェネットを採取した集団) も含めた全国 32 集団 920 ジェネットに対してセルフアサインメントテストによって、それぞれのジェネットがどの集団で生じる可能性が最も高いかを検証した結果、大部分のジェネットが由来とする集団に一番高い確率で割り振られていること (本城 2005; Honjo et al. 2008)、また埼玉県荒川水系江川下流域に自生する野生集団 (上尾集団) の近隣の民家で栽培されていた自生地外系統保存個体が上尾集団由来であることが特定されたこと (吉田ほか 2012) などから、アサインメントテストはサクラソウの由来推定に有用なツールであることが証明されている。しかし、衰退している植物種の場合には、すでに消失した自生地も多く、アサインメントテストに必要な遺伝子型情報を得られないケースがある。このような状況下では、絶滅した集団の代わりに、その集団と遺伝的に近縁関係のある集団の遺伝子型情報を用いて由来を推定する可能性も残されているが、その推定精度は不明である。

サクラソウは地理的距離と遺伝的距離に正の相関が報告されている (Honjo et al. 2009)。そのため、清見町の絶滅した集団 (清見集団) は、直線距離で約 8.5 km しかなかった同じ高山市内にある保護地区として保存されているサクラソウ野生集団 (高山集団) と遺伝的距離が近いことが想定される。そこでサクラソウの地理的な遺伝構造によって、現存する集団の遺伝子型情報からある程度由来を推測できうと考え、アサインメントテストで高山集団に割り振られたジェネットを清見集団由来の可能性があると考えた。以上のことから、本研究では高山市清見町内の民家で栽培されているサクラソウの所有者からの聞き取り調査、SSR マーカーの遺伝子型に基づくジェネット識別と遺伝的な類縁関係の把握、STRUCTURE 解析およびアサインメントテストを行い、清見町内のサクラソウの由来推定を試みた。

材料と方法

材料と採取方法

2012 年から 2013 年にかけて、岐阜県高山市清見町内の民家 14 ヶ所および野外 2 ヶ所の計 16 ヶ所から計 62 個体の葉を採取した (表 1)。サクラソウはジェネット間で花卉の色や形、模様、大きさに変異が見られ、目視

によりある程度ジェネットを識別することができるため (Washitani et al. 1991; Yoshida et al. 2008)、サクラソウの開花期である 5 月に葉を採取し、異なるジェネットと推測される個体から葉を採取した。ただし、野外 2 ヶ所においては、類似した花卉形態でもパッチ状に離れて生育している場合には、それぞれのパッチから葉を採取した。また採取した個体の花型も調査した。所有者が明確な個体に関しては、その個体の入手経緯を把握することを目的として、由来についての聞き取り調査を行った。

解析方法

一部改変した CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) により DNA を抽出し、全国の野生サクラソウ集団の遺伝構造解析に用いた SSR マーカー 8 座 (Honjo et al. 2009) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は Honjo et al. (2009) の方法に従った。PCR 産物の断片長はシーケンサー 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析し、ソフトウェア Gene Scan (Applied Biosystems) により遺伝子型を決定した。その後、これらの遺伝子型に基づいてジェネット識別を行った。

清見町内で見つかったジェネット間の遺伝的な類縁関係を推定するため、ソフトウェア SplitsTree4 version 4.15.1 (Huson and Bryant 2006) を用いて、Neighbor-net algorithm (Bryant and Moulton 2004) に基づき、p-distance より Neighbor Net を作成した。

北海道から九州までの全国 32 集団由来の 920 ジェネット (Honjo et al. 2009) と清見町で見つかったジェネットを対象に STRUCTURE 解析 (STRUCTURE ver. 2.3.2.1, Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) を行い、32 集団と清見集団の各ジェネットの遺伝的組成を評価した。32 集団の中に岐阜県高山市の現存集団 (高山集団) を含め、清見町で見つかったジェネットを 1 つの集団 (清見集団) とみなして解析を行った。また Admixture model に基づいて 10000 回の burn-in を行った後、10000 回の MCMC によるシミュレーションを行い、これらの設定で $K = 1-20$ について 10 回の繰り返しで計算した。Evanno et al. (2005) に基づき、 K 間での対数尤度比の変化率 (ΔK) を算出し、値が最も高い K 値を最適なクラスター数とした。

清見集団由来のサクラソウを推定するため、ソフトウェア GeneClass2 (Piry et al. 2004) を用いてアサインメントテストを行った。まず Rannala and Mountain (1997) の手法により、清見町で採取した各ジェネットのマルチローカス遺伝子型が上述の各 32 集団で生じる尤度を算

表 1. 清見町内で採取した個体情報と聞き取り調査に基づく由来。
Table 1. Information on the 16 genets detected in Kiyomi.

ジェネット	花型	採取数	栽培 民家数	所有者/ 採取地	生育状況	聞き取り調査に基づく由来
g1	P	12	4	A 氏	庭で複数のパッチをを形成、生育良好	どこかから購入または譲渡された、数株を I 氏に譲渡
				C 氏	庭で多数のラメットが密集して生育、生育良好	高山市の住民から 1 ラメット譲渡された
				D 氏	庭で数ラメットがパッチを形成	近所の E 氏からもらった可能性もあるが不明
				I 氏	鉢で生育	A 氏から譲渡
g2	P	5	1	F 氏	複数ラメットでパッチを形成	本人と周囲の聞き取りから自生地由来の可能性
g3	T	6	1	F 氏	複数ラメットでパッチを形成	本人と周囲の聞き取りから自生地由来の可能性
g4	T	6	2	I 氏	庭で 40 ラメットほどが生育	生息域外保全のため生育地から保護
				H 氏	庭の石垣の端に生育するが、成長あまりよくない	不明
				野外	パッチを形成せず、ぽつぽつと離れて生育 見た目はすべて同じジェネットに見える	保育園の敷地内であるため、敷地造成に用いた土に混じっ ていた可能性があるが不明
g5	P	2	1	B 氏	同一ジェネットだと思われる 150 ラメット程度が密集して生育	自生地からと証言するが、記憶がやや曖昧
g6	P	7	2	I 氏	庭で 40 ラメットほど生育	生息域外保全のため生育地から保護
				J 氏	5 ～ 10 ラメットほどかたまっって生育	生息域外保全のため生育地から保護
				野外	林の中の小さな人工池の周りに 25 ラメットほど生育	生息域外保全のため生育地から保護
g7	T	2	1	E 氏	数ラメットが生育	本人も家族も不在のため不明
g8	P	2	1	D 氏	庭で数ラメットがパッチを形成	近所の E 氏からもらった可能性もあるが不明
g9	T	3	1	D 氏	庭で数ラメットがパッチを形成	近所の E 氏からもらった可能性もあるが不明
g10	P	3	1	D 氏	庭で数ラメットがパッチを形成	近所の E 氏からもらった可能性もあるが不明
g11	P	4	2	F 氏	庭で数ラメットがパッチを形成	近所の人から譲渡された記憶あり
				O 氏	鉢で生育	不明
g12	P	2	1	O 氏	鉢で生育	不明
g13	P	2	1	M 氏	自宅前の道路沿いに生育	不明
g14	T	2	1	K 氏	複数の鉢や庭先で生育、生育良好 見た目はすべて同じジェネットに見える	自生地からと証言するが、記憶がやや曖昧
g15	T	2	1	N 氏	大きなパッチを形成しているが、日当たりがよい 見た目はすべて同じジェネットに見える	K 氏から譲渡との証言 (K 氏の個体と遺伝子型が不一致)
g16	T	2	1	L 氏	大きな鉢で生育	不明

出し、由来する可能性の高い候補集団を見出した。次に Paetkau et al. (2004) の手法により、各集団の遺伝子頻度に基づいて Monte-Carlo resampling 法を用いてそれぞれの集団で生じるマルチローカス遺伝子型を 10000 個仮想的に作出した後、これらのマルチローカス遺伝子型がその集団で生じる尤度を計算し、尤度の分布を作成した。清見町で採取した各ジェネットの尤度を、作成した尤度分布と比較し、分布の下端（1% 以下）に位置する場合は、その集団由来とはいえないと考えた。今回用いた 32 集団の F_{ST} は 0.194 であった。

結 果

清見町内で見つかったジェネット

SSR マーカー 8 座で遺伝子型を決定したところ、62 サンプルから 16 ジェネットが見出された（表 1）。長花柱花ジェネットが 9、短花柱花ジェネットが 7 と花型に大きな偏りはなかった。複数のジェネットを栽培している民家は 4 ヶ所（D 氏、F 氏、I 氏、O 氏宅）と少なく、ほとんどの民家では 1 ジェネットのみの栽培であった。またジェネット g1、g4、g6、g11 は複数の場所で栽培されており、そのうちの g4 と g6 は野外でも生育していた。見た目で識別しやすい濃いピンク色の大きな花卉と明るい緑色をした葉をもつ g1 が、最も多くの場所で栽培されており、g5 と g11 も g1 と類似した花卉形態を示していた。遺伝子型を見ると、g5 と g11 は SSR マーカー 8 座のうち 7 座で g1 と同じ遺伝子型を示していた（付録 1）。

所有者への聞き取り調査

I 氏と J 氏の証言によると、I 氏と J 氏が栽培するジェネット g4 と g6 は、かつて町内に存在したサクラソウ自生地が土地改変の直前に、系統保存の意味を含めて清見町の住民が現地から採取したものであることが判明した（表 1）。野外で見つかった g6 もまた、清見町の住民が生息域外保全のために、自身の所有する広葉樹林内に造成した人工池の周辺に自生地から移植されたものであることが周囲の証言で明らかとなった。また同じ民家の庭先で栽培されていた g2 と g3 は、家族や近所の住民から F 氏が以前自生地から採取したものであるとの証言を得た。同様に野外で採取した g4 の由来は不明であった。

最も多くの場所で栽培されていた g1 は、所有者の聞き取り調査より自生地由来ではない可能性が高いことが示されたが、類似した花卉形態を示した g5 と g11 の由

来とは一致しなかった。一方で、聞き取り調査で由来が全くわからなかったのは g7、g12、g13、g16 の 4 ジェネットであった。残りの g5、g8、g9、g10、g11、g14、g15 に関しては、自生地由来の可能性のあるものの所有者の記憶が曖昧のため、自生地由来であるか否かは不明であった。以上の聞き取り調査の結果より、複数の類似した内容の証言が得られた g2、g3、g4、g6 は清見の自生地由来である可能性が高いジェネットであることが明らかになった。

ジェネット間の類縁関係

Neighbor Net に基づくジェネット間の類縁関係から、清見町の 16 ジェネットは大きく 2 群に分かれることが示された（図 1）。聞き取り調査より清見集団由来であるとされた 4 ジェネット（g2、g3、g4、g6）は同じ群に含まれており、g2 と g3、g6 は特に遺伝的に近縁であることが明らかになった（図 1）。この群に含まれる残りの g12、g13、g15、g16 はいずれも聞き取りにおいて由来が不明のジェネットであったが、由来が確からしいとされる上述の 4 ジェネットと遺伝的に近縁であることも明らかになった。花卉や葉の形態が類似しているジェネット g1 と g5、g11 は極めて近い類縁関係がみられた。また g7 と g8、g9、g10 も非常に遺伝的に近縁であり、不確かな情報ではあるが、g8 と g9、g10 は近所の g7 の所有者である E 氏から譲渡された可能性があり、現在 D 氏宅の庭で栽培されているジェネットであった。また、Neighbor Net からは、雑種と判断できるジェネットはみとめられず、16 ジェネット間での交雑が起きているとは判断できなかった。

SSR マーカーの遺伝子型に基づく STRUCTURE 解析とアサインメントテスト

先行研究（Honjo et al. 2009）で用いた 920 ジェネットに、清見町で見つかった 16 ジェネットを加えた計 936 ジェネットで STRUCTURE 解析を行ったところ、 ΔK が最大となった $K = 2$ では北海道由来の 8 集団とそれ以外の 25 集団の 2 つのクラスターに分類され、先行研究（Honjo et al. 2009）と同様の結果を示した（図 2a）。Evanno et al. (2005) に従い、それぞれの個体をより最適にクラスタリングするために階層構造を考慮し、遺伝的に大きく異なる北海道の 8 集団を除いて再度 STRUCTURE 解析を行った結果、 ΔK が $K = 3$ で最も大きな値を示し、こちらも先行研究と同様の結果となった。3 つのクラスターではそれぞれ東北、関東・中部、西日

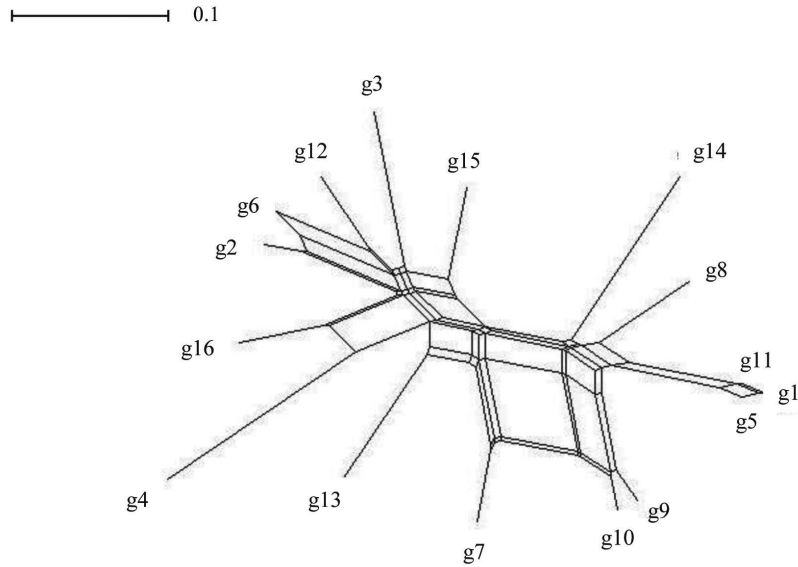


図 1. Neighbor Net 解析による清見町内で見つかったジェネット間の遺伝的類縁関係。

Fig. 1. Genetic relationships among the 16 Kiyomi genets based on Neighbor Net analysis.

本の集団で分かれ、地理的な分布を反映していた（図 2b）。先行研究（Honjo et al. 2009）と同様、高山集団は地理的に近い関東や中部地方の集団ではなく、東北地方に自生する集団と近い遺伝的組成を示し、高山集団の遺伝的組成が地理的な位置関係から予想されるものとは異なっていた（図 2b, c）。清見集団では割合が異なるものの、高山集団と同じように 3 つのクラスターが含まれている点で類似した遺伝組成を示した。聞き取り調査から清見由来と考えられた 4 ジェネットに着目すると、g2 と g6 ではクラスター 1 が優占しており、清見町で見つかった大部分のジェネットがこの遺伝的組成のパターンを示した（図 2c）。また g3 はクラスター 2 が、g4 はクラスター 3 が優占していた。

16 ジェネットを対象に全国 32 集団に対してアサインメントテストを行った結果、いずれかの集団で生じる確率が 0% より有意に高くなったのは g3、g4、g12、g16 の 4 ジェネットであった（表 2）。そのうち、清見集団と遺伝的に最も近縁であると想定された高山集団から生じる可能性があったのは g3 だけであったが、高山集団から生じる確率は 1.09% と低かった。また、清見集団由来である可能性のある残りの 3 ジェネットは、高山集団に割り振られなかった。

考 察

清見集団由来のジェネット

自生地が消失してから 20 年以上が経過していたが、清見町内の 14 軒の民家と野外 2 箇所で見つかった 16 ジェネットのうち、所有者等の明確な記憶から聞き取り調査によって 4 つのジェネット（g2、g3、g4、g6）が清見集団由来である可能性が高いことがわかった。これら 4 ジェネットは遺伝的に近縁な関係にあり（図 1）、そのうち g3 は、アサインメントテストで上尾集団に次いで高山集団に割り振られたが（表 2）、その確率は 1.09% と低く、このジェネットが清見集団由来であると判断するには不十分であった。また STRUCTURE 解析では、g3 は高山集団と同じクラスター 3 が優占していたが、それ以外の 3 ジェネットは高山集団とは異なる遺伝組成のパターンを示していた（図 2c）。このような集団内に優占するクラスターとは異なる遺伝組成を持つジェネットが存在する事例は、阿蘇の集団や中国地方の集団でも見られていることから（本城 2005）、これらが清見集団由来ではないと判断する理由にはならないと言える。一方で、記憶に曖昧さがあるものの自生地由来であるとの証言を得た g5 については、聞き取り調査で自生地由来でないと判断された g1 と似た花卉形態を示し、遺伝的にも非常に近縁であることから（図 1）、清見集団由来のサクラソウではない可能性が高く、同様の理由で g11

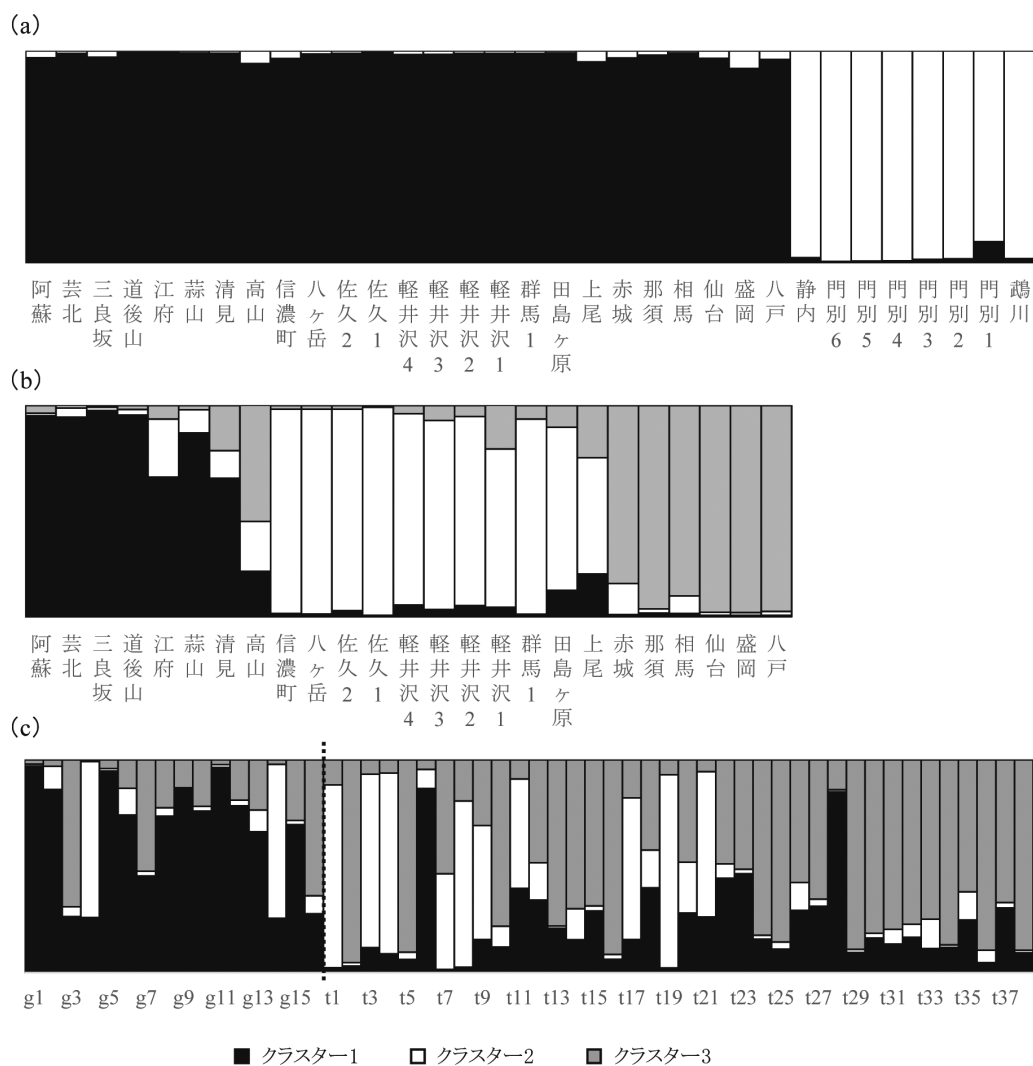


図 2. 清見町で見つかった 16 ジェネットと全国 32 集団を対象とした STRUCTURE 解析の結果。(a) 清見町で見つかった 16 ジェネットを清見集団として加えた全国 33 集団の遺伝構造、(b) 清見集団と北海道の 8 集団を除いた全国 24 集団の遺伝構造、(c) 清見町 16 ジェネットと高山集団 38 ジェネットの遺伝構造: g1 ~ g16 は清見町 16 ジェネット、t1 ~ t38 は高山集団 38 ジェネットを示す。

Fig. 2. Results of STRUCTURE analysis using 16 Kiyomi genets (Kiyomi population) and 32 wild populations. (a) Genetic structure of the Kiyomi population and 32 wild populations. (b) Genetic structure of the Kiyomi population and 24 wild populations, excluding eight Hokkaido populations. (c) Genetic structure of 16 Kiyomi genets (g1-g16) and 38 Takayama genets (t1-t38).

も清見集団由来ではないと判断した。本研究では、DNA 解析では明確に清見集団由来とするジェネットを特定することはできなかったが、少なくとも聞き取り調査から4ジェネットは清見集団由来の可能性が非常に高いことが判明した。これらを清見集団由来のサクラソウとして、きちんと整理し、系統保存していくことが望ましい。

遺伝情報のない集団を由来元にする場合のアサインメントテストの有用性

絶滅の危険性のある種において、個体の由来推定は自生地の回復や復元などに活用される。しかし、由来推定の手法のひとつであるアサインメントテストには、由来元となる集団の遺伝子型情報が必要あり、すでに消失した集団や個体数が激減した集団では解析に足る遺伝情報が得られない場合もある。本研究で用いたサクラソウで

表 2. アサインメントテストに基づく 32 集団のうち各ジェネットが由来する確率の高かった上位 3 集団。

Table 2. Top three populations with high probabilities of originating from the 16 Kiyomi genets based on the assignment test.

ジェネット	第一集団	第二集団	第三集団
g1	-	-	-
g2	-	-	-
g3	上尾 (4.19%)	高山 (1.09%)	-
g4	上尾 (3.80%)	-	-
g5	-	-	-
g6	-	-	-
g7	-	-	-
g8	-	-	-
g9	-	-	-
g10	-	-	-
g11	-	-	-
g12	蒜山 (17.08%)	上尾 (1.63%)	三良坂 (1.06%)
g13	-	-	-
g14	-	-	-
g15	-	-	-
g16	上尾 (7.58%)	-	-

太字：聞き取り調査から清見集団由来の可能性が高かったジェネット

() 内はその集団から由来する確率を示す

は、地理的距離と遺伝的距離の正の相関が報告されている (Honjo et al. 2009)。また先行研究 (本城 2005 ; Honjo et al. 2008) による 32 集団全 920 ジェネットに対するセルフアサインメントテストでは、大部分のジェネットが由来とする集団に一番高い確率で割り振られた一方で、由来元でなく同一地域内に位置する集団に割り振られたジェネットも一部確認された。そこで本研究では、由来元となる集団が消失していた場合でも、状況によっては地理的に近い別の集団の遺伝情報を用いることで個体の由来推定ができる可能性から、高山集団の遺伝子型情報を用いたアサインメントテストを試みた。しかし、聞き取り調査により清見町由来と考えられるジェネットを高山集団由来であると支持する結果は得られなかった。これらのジェネットが高い確率で高山集団に割り振られなかった原因について考えてみると、アサインメントテストでは、例えば地理的に近い集団でも、それらが遺伝的に分化していた場合には割り振られないと想定される。しかし、直線距離でおよそ 17 km 離れている埼玉県内の上尾集団と田島ヶ原集団の pairwise F_{ST} は全集団の組み合わせの中でも最も低い 0.030 であることから、その半分のおよそ 8.5 km しか離れていない清見集団と高山集団が遺伝的に大きく分化しているとは考えにくい。そのため先行研究 (Honjo et al. 2009) で報告された、地

理的な位置関係では説明できない高山集団の遺伝組成が、清見集団由来のジェネットが割り振られなかった原因と考えられた。もし高山集団と同一地域内に多数の集団が現存していれば、高山集団の遺伝組成がこの地域では共通したものなのか、他地域由来の個体が混入したことによるものなのかを検証することも可能だが、高山集団しか残存していない現在ではその検証ができない。本研究では、サクラソウの自生地が消失、またその周辺の野生集団が大きく減少した状況下では、個体の由来推定の精度が大きく低下することが示された。サクラソウ個体の由来推定には、現存する自生地の保全は大前提として、少なくとも現在絶滅の危険性のある集団については出来る限りその遺伝情報を取得しておくことが望ましいと言える。一方で、現在は過去の生物標本を用いたマイクロサテライト解析によって、すでに絶滅した集団の遺伝構造を把握することが可能となった (Nakahama and Isagi 2018)。サクラソウにおいても、絶滅した集団や個体数が激減した集団の生物標本が残されている場合には、そこから遺伝情報を得ることで、これまでよりも正確に由来推定ができることが期待される。

本研究のように明確な由来推定ができなかった場合、所有者からの由来情報が極めて重要となる。A 氏から I 氏へ譲渡されたとされる個体の遺伝子型が聞き取り調査で得られた情報と一致した例もあったが、K 氏から譲渡されたという N 氏の個体が K 氏の栽培する個体の遺伝子型と一致しなかったように、所有者の情報が必ずしも正確ではないことが示された。清見町内には高齢の所有者も多く、自生地の消失からの時間の経過によって記憶が曖昧になったためと考えられることから、所有者からの由来情報しかない場合には必ず複数の人の証言を得ることが必要となる。サクラソウの野生集団の減少により、今後自生地由来の個体を用いた自生地復元の試みが行われることが予想される。由来の推定にはアサインメントテストなどの DNA 解析に加えて、過去の生育の記録や周囲の住民からの聞き取り調査などを行い、慎重なジェネット選別を行っていくべきである。

まとめ

現存する野生集団の減少に伴い、本来の遺伝構造の解明やそれに基づく系統保存個体の由来の推定が困難になるケースは、多くの絶滅危惧種において起こりうると考えられる。本研究では、現存するサクラソウの自生地が非常に限られている岐阜県において、聞き取り調査と

SSR マーカーの遺伝子型に基づくジェネット識別、STRUCTURE 解析、アサインメントテストを行い、すでに野生状態では消失した高山市清見町由来のサクラソウ系統保存個体を特定しようと試みた。その結果、聞き取り調査から清見由来の可能性のあるサクラソウ4ジェネットを見出し、それらが遺伝的に近縁であること、またそのうちの1ジェネットはアサインメントテストにおいて近隣に現存する高山集団に割り当てられるとの結果が得られたが、遺伝子型情報に基づく確実な裏づけはとれなかった。しかしながら消失した自生地由来の個体推定の1つの取組みとして、高山市での経緯や現状をとりまとめておくことに意義があると考え、本稿で報告した。

謝 辞

本研究は、サクラソウの葉の採取と聞き取り調査に快くご協力いただいた清見町の方々と清見まちづくり協会の皆様の多大なるご尽力を頂戴して成しえたものである。ここに深甚なる謝意を表する。本研究の成果が清見町のサクラソウ保全の一助になれば幸いである。また、農研機構東北農業研究センターの本城正憲氏にはデータ解析に用いた基本データのご提供およびその解釈について有益なコメントを、神奈川大学理学部生物科学科の岩崎貴也氏には Neighbor Net 解析について有用なご助言をいただいた。ここに深く感謝申し上げる。

引用文献

- Bryant D, Moulton V (2004) Neighbor-net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21:255-265
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153:1989-2000
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164:1567-1587
- 岐阜県 (2001) “岐阜県の絶滅のおそれのある野生生物-岐阜県レッドデータブック-2001”, https://www.pref.gifu.lg.jp/kurashi/kankyo/shizenhogo/c11265/index_20300.html, 確認日2019年4月16日
- 岐阜県博物館学芸部自然係 (編) (1993) 失われゆく植物。

- 岐阜県博物館友の会, 岐阜
- 本城 正憲 (2005) サクラソウ集団における遺伝的多様性の保全に関する分子生態遺伝学的研究. 筑波大学大学院生命環境科学研究科, 博士論文
- 本城 正憲, 北本 尚子 (2010) 植物の保全遺伝学的解析・評価法. (鶯谷 いづみ, 宮下 直, 西廣 淳, 角谷 拓 編) 保全生態学の技法－調査・研究・実践マニュアル－, 63-81. 東京大学出版会, 東京
- Honjo M, Kitamoto N, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2009) Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. *Conservation Genetics*, 10:257-267
- Honjo M, Ueno S, Tsumura Y, Handa T, Washitani I, Ohsawa R (2008) Tracing the origins of stocks of the endangered species *Primula sieboldii* using nuclear microsatellites and chloroplast DNA. *Conservation Genetics*, 9:1139-1147
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23:254-267
- Iwatsuki K (2008) Endangered vascular plants in Japan. -Present status and a proposal for conservation-. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 84:275-286
- 環境庁 (編) (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物－レッドデータブック8植物I (維管束植物). 自然環境研究センター, 東京
- 清見村教育委員会 (編) (1989) ふるさと植物誌. 岐阜県大野郡清見村役場, 清見
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution*, 20:136-142
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:4321-4325
- Nakahama N, Isagi Y (2018) Recent transitions in genetic diversity and structure in the endangered semi-natural grassland butterfly, *Melitaea protomedia*, in Japan. *Insect Conservation and Diversity*, 11:330-340
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: A simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13:55-65
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95:536-539
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

94:9197-9201

Yamazaki T (1993) *Primula*. In: Iwatsuki K, Yamazaki T, Boufford DE, Ohba H (eds), *Flora of Japan IIIa*, 87-94. Kodansha, Tokyo

吉田 康子, 小玉 昌孝, 本城 正憲, 大澤 良 (2012) 埼玉県荒川水系江川下流域に自生するサクラソウ野生集団における遺伝的多様性の維持・回復のための保全遺伝学的研究. 保全生態学研究, 17:211-219

Yoshida Y, Honjo M, Kitamoto N, Ohsawa R (2008) Genetic variation and differentiation of floral morphology in wild *Primula sieboldii* evaluated by image analysis and SSR markers. *Breeding Science*, 58:301-307

鷺谷 いづみ (2006) サクラソウ 植物と保全と進化を科学する. (鷺谷いづみ 編) サクラソウの分子遺伝生態学 エコゲノムプロジェクトの黎明, 1-14. 東京大学出版会, 東京

Washitani I, Namai H, Osawa R, Niwa M (1991) *Species*

biology of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat population: I. Inter-clonal variations in the flowering phenology, pollen load and female fertility components. *Plant Species Biology*, 6:27-37

付 録

付録1 清見町内で出された16ジェネットのSSRマーカー8座の遺伝子型情報。

リンクが示されていない付録は本文のオンラインサイトに掲載。

<https://doi.org/10.18960/hozen.1921>